

**UNIVERSIDAD SAN PEDRO**  
**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA**  
**PROGRAMA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**



**Toxicidad oral a 30 días del extracto etanólico de las hojas  
de *Bixa orellana l.* (achiote) en ratas.**

**Tesis Para Obtener el Título de Químico Farmacéutico**

**AUTORAS**

**Br. Motta Rodríguez Lesly Elizabeth**  
**Br. Paucar Palacios Sthefanie Ambar**

**ASESOR**

**Mg. Sarmiento Espinoza Soledad Elizabeth**

**Chimbote – Perú**

**2019**

**i.-Palabras clave**

<b>Tema</b>	<b>Fitoterapia</b>
<b>Especialidad</b>	<b>Farmacia y Bioquímica</b>

**Keywords**

<b>Subject</b>	<b>Phytotherapy</b>
<b>Speciality</b>	<b>Pharmacy and Biochemistry</b>

<b>Línea de investigación</b>	<b>Estudios etnobotánicos de recursos naturales terapéuticos</b>
<b>Área</b>	<b>Ciencias médicas y de la salud</b>
<b>Subárea</b>	<b>Medicina básica</b>
<b>Disciplina</b>	<b>Farmacología y farmacia</b>

## **ii.- Título**

Toxicidad oral a 30 días del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana l.*  
(achiote) en ratas.

### **iii.- Resumen**

Los extractos vegetales nos ofrecen una gama de efectos terapéuticos, pero pocos estudios se han realizado de los efectos secundarios de éstos cuando se consumen de manera prolongada y en una dosis inadecuada, por tal motivo la presente investigación tuvo como objetivo determinar la toxicidad oral a dosis repetidas durante 30 días del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (achiote) en ratas. Las plantas fueron recolectadas en el centro poblado de Cascajal, provincia de Santa, departamento de Ancash, la identificación taxonómica se realizó en el museo de historia natural de UNMSM Lima-Perú, se obtuvo el extracto y se realizó el estudio fitoquímico encontrando gran cantidad de taninos y flavonoides; se observó que el extracto no afecta el crecimiento ni el peso de las ratas, así como no hay alteraciones en los parámetros de bioquímica sanguínea. Concluyendo que el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* (achiote) administrado por vía oral durante 30 días en ratas no es tóxico.

***Palabras clave:*** Toxicidad oral, extracto etanolico, *Bixa orellana* L. achiote..

#### **iv.-Abstract**

The plant extracts offer us a range of therapeutic effects, but few studies have been carried out of the side effects of these when they are consumed for a long time and at an inappropriate dose, for this reason the present investigation aimed to determine oral toxicity at doses repeated for 30 days of the ethanol extract of the leaves of *Bixa orellana* (achiote) in rats. The plants were collected in the town center of Cascajal, Santa province, Ancash department, the taxonomic identification was made in the natural history museum of UNMSM Lima-Peru, the extract was obtained and the phytochemical study was carried out, finding a large amount of tannins and flavonoids; It was observed that the extract does not affect the growth or weight of the rats, as well as there are no alterations in the parameters of blood biochemistry. Concluding that the ethanol extract of the leaves of *Bixa orellana* (achiote) administered orally for 30 days in rats is not toxic.

Keywords: Oral toxicity, ethanol extract, *Bixa orellana* L. achiote

<b>INDICE</b>	<b>Pág</b>
Palabras clave .....	i
Título de la investigación .....	ii
Resumen .....	iii
Abstract .....	i v
Índice .....	v
Introducción .....	01
Antecedentes y fundamentación científica .....	01
Justificación de la investigación .....	09
Problema .....	15
Marco Referencial .....	19
Hipótesis .....	39
Objetivos .....	39
Metodología .....	40
Tipo y Diseño de investigación .....	40
Población y Muestra .....	41
Técnicas e instrumentos de investigación .....	41
Resultados .....	48
Análisis y Discusión .....	51
Conclusiones .....	54
Recomendaciones .....	55
Agradecimientos .....	56
Referencias Bibliográficas .....	57
Anexos .....	64

## **I. Introducción**

### **1.1. Antecedentes y fundamentación científica.**

La evaluación de la toxicidad aguda y subcrónica del extracto hidroetanólico de semillas de *Parinari curatellifolia* (Chrysobalanaceae) en ratas demostró la actividad hipoglucémica y alta capacidad para reducir factores de riesgo cardiovascular. Su extracto en dosis bajas y moderadas no presentó efectos nocivos en los tejidos de los roedores. Pero a elevadas dosis pueden causar daño a los riñones, incluso llevar a una insuficiencia renal con efectos tóxicos al corazón. Es muy importante que las funciones del corazón y los riñones deben estar controlados en un tratamiento a largo plazo con altas dosis de *P. curatellifolia* (Ogbonnia et al., 2009).

La especie *Smallanthus sonchifolius* se utiliza como antidiabético en algunos países, incluyendo Brasil. La acción hipoglucemiante actualmente se demuestra en ratas normales y diabéticas. Los estudios sobre la seguridad de consumo oral prolongado de extractos de sus hojas no se habían realizado. Barbosa de Oliveira y col. (2011) evaluó la toxicidad de cada extracto en un estudio a dosis repetidas en ratas Wistar durante 90 días. Dando como resultado un severo daño renal con aumento de los niveles de glucosa en sangre. Esto demuestra que su efecto hipoglucemiante después del tratamiento durante 90 días en un estudio anterior es reversible y da como resultado una lesión renal. Debido a que se detectaron las sesquiterpenolactonas en los extractos, existe evidencia de que son los principales compuestos tóxicos. Por lo tanto no se recomienda el uso oral de *S. sonchifolius* para tratar la diabetes.

Núñez (2011) en su investigación “Efecto Antiinflamatorio y toxicidad aguda del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) en

ratones albinos”. Su efecto toxico fue evaluada por el método de Lorke. La toxicidad aguda, se realizó en roedores por el procedimiento Lorke, dando como resultado una dosis letal de 3800 mg/kg. Concluyendo que el tipo vegetal *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) es ligeramente tóxica.

Aybar y Ari (2018) en su estudio efecto antiinflamatorio y toxicidad aguda del extracto etanólico de las hojas de *Nasa urens* (Jacq.) Weigend en ratas. Para evaluar su toxicidad aguda se empleo el método OECD se utilizaron 35 ratones hembras, administrando cantidades de 1000, 3000,5000 y 10000mg/kg. El resultado por la toxicidad aguda de 1000 y 3000 mg/kg no evidenciaron signos tóxicos, en cantidades de 5000 y 10000 mg/kg evidencio un comportamiento pasivo, inmovilidad, aumento de heces acuosas y blandas, y restos de orina, muerte de ratones a una porción de 10 000 mg/kg. Finalizamos que dicho estudio no presenta toxicidad aguda.

Lagarto y col. (2005) en su informe denominado Toxicidad aguda oral y subcrónica en ratas de un extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. realizó tres estudios: indicadores hematológicos, bioquímica clínica, necropsia y examen histopatológico concluyendo que la especie no presenta toxicidad significativa atribuible a la sustancia de la prueba.

## **1.2. Justificación de la investigación**

Desde la antigüedad el ser humano ha utilizado métodos naturales para aliviar sus enfermedades, éstas técnicas cuando daban resultado eran trasmitidas de generación en generación y han permanecido hasta la actualidad. Los editores del New England Journal of Medicine manifiestan que la comunidad científica debe



contener el libre desarrollo de la medicina alternativa. Es entonces que los investigadores empezaron a publicar investigaciones clínicas que todavía no son suficientes, pues muchos de los fármacos naturales que se expenden carecen de los estudios preclínicos establecidos (Marcia, 2007).

Es verdad que extraer, aislar e identificar estos productos alternativos, se ha realizado en años recientes, la finalidad para lo cual estas sustancias se utilizan en la actualidad es la misma que le dieron las generaciones anteriores; con la diferencia que en estos momentos ya se está en condición de utilizar el acelerado desarrollo de la fitoquímica para demostrar las investigaciones en estas plantas (Pérez, 2007).

Para garantizar la seguridad de estos preparados fotoquímicos se establecen controles internacionales, que exigen extensas investigaciones fármaco-toxicológicas en especies de experimentación antes de aplicarlos en seres humanos (Centro para el control de la calidad de los medicamentos, 1998).

La utilización de las plantas con propiedades farmacológicas debe efectuarse sobre pruebas científicas que validen la seguridad y que sean inofensivos; por lo tanto, aunque se obtengan óptimas respuestas en algunas etapas del estudio preclínico ningún producto puede ser aplicado hasta no completar su investigación. (Zuluaga, 2002).

La OMS posee un proyecto de asesoramiento y estimulación para el uso de plantas medicinales, especialmente para la atención primaria. El informe de esta organización establece que el 80% de la población del mundo hace uso de las plantas con este fin. (Zang, 1996).

La utilización de plantas medicinales es común en nuestro país, no sólo por motivos socioeconómicas, sino también debido a que se siguen las tradiciones de nuestros antepasados. No existe un registro sobre la cantidad de consumo y compra de plantas, que frecuentemente se usan, pero se supone que esta es muy alta por las condiciones anotadas y por la difusión y propagandas para el uso de estas medicinas alternativas (Zuluaga, 1992).

El consumo de la fitoterapia en la sociedad debe efectuarse teniendo en consideración ciertas pautas para llegar a producir los efectos deseados. (Villaescusa, 2006).

La medicina natural establece el uso de plantas o sus partes en su estado original, y constituye importantes fuentes de nuevas moléculas de amplia acción terapéutica y tiene su origen en ellas (Villaescusa, 2006).

Los productos herbarios han llegado a alcanzar gran importancia en diversos países del mundo incluyendo países desarrollados gracias a diversas entidades y organismos farmacéuticos que siguen en la investigación (García, 2000).

Estos productos médicos alternativos pueden ser utilizados en la terapia con buenos resultados es por eso que se debe desarrollar un óptimo sistema de control y producción, implementando reglamentos sanitarios de control que garantice la calidad y que establezca seguridad (Erichs, 2004; Velazco, 1999).

La OMS establece necesario apartar la tradición de la realidad, que están íntimamente unidos en medicina tradicional, que permitan distinguir los remedios

efectivos de los ineficaces. Razón por la que OMS promueve el uso procedimiento que aseguren la eficacia y calidad (Morón, 2002; Okerele, 1984).

Hay varios estudios que se deben hacer antes de usarlos en seres humanos. A un nuevo fármaco no se puede exigir lo mismo que a una nueva molécula sintética a la que nunca el ser humano ha estado expuesto si se desconoce sus efectos y reacciones adversas. Quiere decir que no se le puede dar fe a la sabiduría popular sobre la eficacia de las plantas, ya que éstas pueden poseer diversas sustancias con acciones biológica que puede producir cualquier efectos no deseados que a veces pasan desapercibidos. (Moronis, 2002).

La utilización de plantas medicinales como alternativas a los medicamentos se está incrementando, esto debido a que están al alcance socioeconómico y son de fácil acceso. También erróneamente se cree que estas plantas medicinales no tienen reacciones adversas (Larrey, 1994; Ernsts, 2005). Otros establecen que estos medicamentos han sido rechazados por que no fueron científicamente evaluados y su seguridad ha sido incierta (Ernst, 2005). Debido a esto es necesario efectuar estudios eficaces que garanticen su administración clínica en pacientes, para evitando riesgos durante su tratamiento

Se considera al Perú, como el tercer país que ha aportado diferentes especies y variedades de plantas todo esto a la diversidad de pisos ecológicos y microclimas. Hoy en día, esta riqueza de agentes terapéuticos vegetales unida al conocimiento antiguo en el uso etnofarmacológico, equivale un valioso recurso por explotar ordenadamente y sostenido especialmente para las comunidades indígenas (Li, 2005).

La presencia de plantas medicinales fue muy notoria en textos farmacológicos del mundo hasta los años 40 - 50. Luego los medicamentos sintéticos tienen mayor auge que la medicina alternativa. (Baumasn, et al., 1986) Actualmente el 80% de la población mundial no tiene alcance a los medicamentos sintéticos. (Farnsworth et al., 1985) Para el porcentaje mencionado la medicina tradicional sigue siendo su fuente principal de tratamiento de enfermedades. Asimismo el 25 % de los medicamento de los países desarrollados contienen ingredientes obtenidas de las plantas. (Farnsworth et al., 1984).

En 2002 la OECD sugiere que para la determinar de toxicidad aguda y dosis letal se sustituya por tres procedimientos alternos cuya finalidad sea disminuir cantidades de animales que se utilizan para reducir el sufrimiento de estos. (OECD,1998).

### **1.3 Problema**

Los estudios de nocividad de las plantas para uso médico se hacen necesarias, es verdad que algunos son protectores, otros tienen nocividad e interfieren interferencia con la evolución y desarrollo (Pascual-Villalobos, 1998; Barras et al., 2007). También se conoce que los extractos vegetales tienen acción terapéutica comprobado científicamente que facilita su empleo en muchas enfermedades, por lo que caracterizar su potencial tóxico es de gran importancia para avalar su empleo como agente terapéutico (Lagarto et al., 2008).

Por lo anterior expuesto el equipo de trabajo nos planteamos el siguiente problema: ¿El extracto etanólico de *Bixa orellana* L. (achiote) será tóxico si es administrado a dosis de 100 mg/kg durante 30 días por vía oral en ratas?, lo cual nos permitiría determinar si esta sustancia causa daños en los pacientes cuando la administración es por periodos amplios cuando se utiliza para tratar diversas enfermedades prevalentes, además la especie en mención es muy utilizada de manera tradicional y de amplia ubicación geográfica en nuestro país.

## **1.4 Marco Referencial**

### **1.4.1. Ensayos de Toxicidad de productos vegetales.**

El empleo de plantas medicinales como alternativas a los medicamentos estándares se está incrementando, esto debido a su bajo precio. También se dice erróneamente que estos medicamentos alternativos no tienen reacciones adversas (Larrey, 1994; Ernst, 2005). Existe también cierto rechazo a estos medicamentos ya que científicamente no han sido evaluados y probados sus valores medicinales y su perfil de seguridad sigue siendo dudoso (Ernt, 2005). Razón por la cual es necesario realizar estudios complementarios de seguridad a estos productos realizando investigaciones experimentales que validen su acción farmacológica y toxicológica para evitar posteriores riesgos en la aplicación de los pacientes.

El Perú es un país mega diverso, el cual ha realizado aportes muy importantes para el mundo gracias a que cuenta con pisos ecológicos, climas variados, además de tener 84 zonas de vida donde se conocerían 50 mil especies

vegetales (20% de las existentes) de las cuales 2000 son utilizados con fines terapéuticos. En la actualidad, la diversidad de estos agentes terapéuticos constituye uno de los mayores conocimientos ancestrales respecto a su uso etnofarmacológico; además de ser un recurso beneficioso en el desarrollo de la humanidad; y aun más de las comunidades nativas que hasta nuestros días han utilizados estos recursos (Li, 2010).

En todas las farmacopeas de los años 40-50, la presencia de las plantas medicinales fue notoria; sin embargo, los medicamentos sintéticos desplazan fuertemente a estos productos en diversos tratamientos terapéuticos (Baumann, et al., 1986). En la actualidad, el 80 % de toda la población aún no tiene el acceso al sistema de salud y por consecuencia a los medicamentos sintéticos (Farnsworth et al., 1985), es por ello que para esta población el uso de la terapia medicinal constituye el principal tratamiento de las enfermedades. Además, en países industrializados el 25% de las prescripciones con medicamentos tienen como componentes, algunos ingredientes que derivan de las plantas (Farnsworth et al., 1984).

En productos de uso medicinal es necesario que se realicen estudios respecto a su toxicidad ya que, si bien algunos poseen efectos protectores, otros presentan toxicidad aguda además de interferir con el crecimiento y desarrollo (Pascual Villalobos, 1998; Barra et al., 2007). También se conoce que algunos extractos vegetales si bien tienen efectos terapéuticos los cuales son avalados por estudios científicos, es necesario caracterizar su toxicidad para poder confiar en

su empleo como agente terapéutico y en la lucha contra las enfermedades (Lagarto et al., 2008).

#### **1.4.2. Clasificación de toxicidad**

**Toxicidad aguda:** Consiste en suministrar a los organismos investigados la sustancia examinada, en una sola dosis por determinada vía, o en la exposición a la sustancia presente en determinada concentración en el aire.

**Toxicidad subaguda:** Consiste en la suministración de la sustancia investigada a los organismos examinados, cotidianamente durante 28 días y en la observación de los efectos tóxicos durante e inmediatamente después de la exposición.

**Toxicidad subcrónica:** Es el efecto nocivo que se presenta como resultado de la exposición repetida cotidianamente o después de la administración de sustancias químicas a los animales de experimentación durante una parte de su vida (no pasando el 10%)

**Toxicidad crónica:** Es el efecto nocivo que se presenta como resultado de la exposición repetida cotidianamente o de suministración de sustancias químicas a los animales de experimentación durante la mayor parte de su vida.

##### **A. Estudios de toxicidad aguda, Dosis única**

**Objetivo:** Determinación de DL-50 u otro efecto adverso.

**Observaciones:**

- Muertes a las 24 horas, 7, 15 y 30 días.
- Finalmente, estudio histológico a todos los animales.
- Pruebas dérmicas en conejos.
- Animales Dos especies, una de no roedores.
- Vías de administración Dos diferentes, según posible incidencia en hombre.

**B. Estudios de toxicidad crónica. Dosis diarias**

- Medio plazo (subcrónica) o dosis repetidas 14, 28 o 90 días.
- Largo plazo (crónica). Mínimo 3 meses, 1-2 años.

**Observaciones:**

- Animales Especies seleccionadas en ensayos previos.
- Usualmente: Roedores con niveles de dosis.

Lotes 2-4 niveles, según DL-50, con 10 animales (cinco machos y cinco hembras) por nivel de dosis, como mínimo.

**C. Estudios especiales**

- 1) Carcinogénesis.



- 2) Teratogénesis
- 3) Fertilidad y viabilidad de descendencia.
- 4) Lactación.
- 5) Adicción.
- 6) Comportamiento operante.
- 7) Metabolismo.
- 8) Metabolismo de órganos aislados.

### **1.4.3. Toxicología**

La toxicología se encarga de la cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición de agentes físicos, sustancias químicas y otras situaciones. La distribución de una sustancia dentro del organismo es un proceso dinámico que depende de las velocidades de absorción y eliminación, así como del flujo sanguíneo en los diferentes tejidos y de las afinidades de éstos por la sustancia. (Silbergeld et al., 1998).

#### **Estudios de toxicidad en roedores**

Todas las drogas naturales tienden a ser tóxicos si sus dosis son elevadas. La utilización de roedores es ideal para encontrar y estudiar sustancias tóxicas que podrían causar efectos nocivos en seres humanos, donde se pueden evaluar sus procesos farmacocinética como absorción,

metabolismo y excreción. Los que deben de cumplir con estándares d ética, teniendo en cuenta los cambios en peso, hematología y efecto sobre órganos blandos (Klaseen y Watkins 2001; Lagarto *et al.*,2005)

#### **1.4.4. Los productos naturales**

Desde su origen los hombres siempre han utilizado las plantas, tanto como parte de su alimentación, así como en el campo curativo al padecer de alguna enfermedad o mal espiritual, así como para cuidarse o prevenir alguna enfermedad. Cuando nuestros antepasados sufrían de alguna enfermedad, solo recurrían a las plantas para el tratamiento de sus enfermedades o del mal que los aquejaba, es así que surgieron muchos tratamientos empíricos y muy eficaces, los cuales fueron de gran utilidad para la industria farmacéutica, además que sirvieron para encaminar proyectos de investigación, que a lo largo del tiempo llegaron concordar con los componentes activos descubiertos por la bioquímica. Estos conocimientos de nuestros antepasados con el transcurrir del tiempo se desarrollaron y se fueron transmitiendo verbalmente de generación en generación (Organismo andino de la salud, 2014)

La inmensa variedad de riqueza natural con que cuenta el Perú, gracias a sus múltiples pisos ecológicos y ecosistema, nos permite tener una inmensa variedad de flora, que cuenta con un número aproximado de 20 000 especies vegetales, las cuales representarían el 8% del total que

existen en la tierra, la gran mayoría de este recurso vegetal se puede ubicar en la Amazonía u oriente peruano y muchos de ellas, en la actualidad, no han sido caracterizadas botánicamente, solo un aproximado de 5000 plantas han sido identificadas botánicamente. Dentro de la gran variedad de flora que existe en el Perú, se encuentran las plantas medicinales que son uno de los recursos importantes de los sistemas de salud tradicional (Organismo andino de la salud, 2014)

En la actualidad en el Perú existen poblaciones donde no tienen acceso a los servicios básicos como son la salud, educación, alumbrado público y otros, es así que se le restringe el acceso a muchos de sus derechos, siendo vulnerado su derecho a la salud, esto motiva a que la población mantenga viva sus costumbres y tradiciones con respecto al uso de plantas medicinales; así como aparecen nuevas enfermedades, esta población también sigue buscando nuevas plantas con efectos farmacológicos, para lo cual emplean tratamientos empíricos (Camacho & Honorio, 2017).

Actualmente gran parte de la población tanto niños, adultos y ancianos que se atienden en los establecimientos de salud, sufren de algún tipo de inflamación, que puede ser una señal de alerta del organismo o causa de algún tipo de enfermedad, así como cuando se extiende el proceso inflamatorio ocasionando daño a nivel celular o tisular, también la inflamación está relacionada con un sin número de enfermedades (La Torre, 2014; Ancalla & Flores, 2017).

Frente a la gran cantidad de casos por inflamación que se relacionan con diferentes enfermedades y que el consumo de fármacos convencionales son muy costosas, evidencian marcados efectos adversos a nivel del sistema digestivo y en el sistema nervioso central, motivando a los pacientes a optar por el consumo de productos naturales menos costosas y que tengan menos efectos adversos, siendo una alternativa las plantas medicinales para curar cualquier tipo de inflamación (Camacho & Honorio, 2017).

El objetivo principal en estudio es demostrar el efecto antiinflamatorio que posee la especie *Nasa urens* (Jacq.) Weingend (ortiga de las lomas) al ser administrados por vía oral y en diferentes dosis a las ratas (animales de experimentación), comparándolo con un patrón, con la finalidad de tener como una alternativa de fitoterapia a la inflamación frente a los fármacos convencionales.

Para conseguir el efecto farmacológico deseado y que no implique riesgos para la salud, es necesario realizar estudios de toxicidad aguda a la especie vegetal *Nasa urens* (Jacq.) Weingend (ortiga de las lomas) en ratones al administrarles por vía oral y en diferentes dosis, teniendo como referencia los datos toxicofarmacológicos de las plantas (Organismo andino de la salud, 2014b)

#### **1.4.5. *Bixa Orellana L.* (achiote).**

*Bixa orellana L.* (achiote):

## **Clasificación Taxonómica**

**Orden:** Malvales.

**Familia:** Bixaceae.

**Género:** Bixa.

**Especie:** *Bixa orellana* L.

Estudios demuestran que las hojas del achiote son utilizadas para aliviar dolores de cabeza, problemas de inflamación de las vías respiratorias, quemaduras, como antídoto para el envenenamiento por *Manihot esculenta* (yuca o yuca brava o yuca amarga o yucca agria), cicatrizante (Herbario de plantas medicinales, 2009), epilepsia, antídoto para las mordeduras de serpientes, desórdenes de la próstata e inflamaciones internas, hipertensión arterial, colesterol elevado, cistitis, obesidad, insuficiencia renal y para eliminar ácido úrico (Herbario de plantas medicinales, 2009), Diabetes mellitus y la ictericia (Lans, 2006), astringente, febrífugo, antidisentérico, diurético, afrodisiaco y para el tratamiento de enfermedades venéreas, erisipelas, fiebres intermitentes (Alonso, 2004).

### **1.5. Hipótesis**

El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) administrado oralmente durante 30 días en ratas no presenta toxicidad.

## 1.6. Objetivos

### Objetivo general:

- ❖ Determinar la toxicidad Oral del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. (achiote) durante 30 días por vía oral en ratas

### Objetivos específicos:

- ❖ Obtener del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. (achiote)
- ❖ Realizar el estudio fitoquímico del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. (achiote)
- ❖ Evaluar la toxicidad oral durante 30 días del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. (achiote) en ratas.

## II. METODOLOGÍA

### 2.1 Tipo y diseño de investigación

#### 2.1.1 Tipo

El estudio es de tipo analítico-experimental, aleatorizado, completo, pre-clínico *in vivo*.

#### 2.1.2 Diseño

Este diseño experimental utilizó la técnica estadística que permitió identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental pre clínico *in vivo*. En este diseño se manipuló

deliberadamente una o más variables, vinculadas a la toxicidad oral subcrónica en ratas.

## **2.2 Población y muestra**

### **2.2.1 Población**

- Ratas Albinas Cepa Holtzmann:
- *Bixa orellana* L. (achiote)

### **2.2.2 Muestra**

- *Rattus rattus* var. *albinus* Cepa Holtzmann: 20 unidades
- *Bixa orellana* L. (angulla): 5 kg

## **2.3. Técnicas e instrumentos de investigación:**

### **2.3.1. Obtención de la muestra vegetal.**

Las hojas de *Bixa Orellana L* (achiote) fueron recolectadas el centro poblado de cascajal, provincia de Santa, departamento de Ancash. Se tuvo en cuenta la integridad y buen estado de las hojas.

### **2.3.2. Obtención del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* (achiote).**

Para la obtención del extracto de achiote se recolectaron las hojas del espécimen vegetal las que lavadas y seleccionadas, posteriormente se desecó en una estufa a 40 °C hasta que las plantas sean crocantes al tacto

para ser triturado en un molino de mano, hasta obtener un polvo fino, y ser macerado con de 96° a temperatura ambiente durante siete días, con un movimiento oscilatorio diario durante 10 minutos, pasado los siete días es filtrado y secado en un recipiente ancho de vidrio a 40°C, utilizando para este fin una estufa hasta la obtención de un peso constante. El residuo sirvió para preparar el extracto a diversas concentraciones, utilizando como sustancia tensioactiva polisorbato de sodio 80° (Tween 80).

### **2.3.3. Estudio fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) (Lock de Ugaz, 2016).**

Para el estudio fotoquímico se tomó una muestra de 500 mg de extracto y se diluyó con metanol químicamente puro, el que se distribuyó en tubos de ensayo con un volumen promedio de 5 mL, en donde se les agregó V gotas de reactivo para determinar la presencia de metabolitos presentes en el extracto vegetal, obtenido con solventes apropiados y la aplicación de reacción de coloración y precipitación siendo las reacciones siguientes:

#### **a) Identificación de Alcaloides**

##### **Ensayo de Dragendorff**

Se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, luego se añadió 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y se procedió a observar



considerándose positivo la formación de un precipitado rojo ladrillo.

#### **Ensayo de Mayer**

Se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, a continuación, se añadió 3 gotas del Reactivo de Mayer y se procedió a observar considerándose positivo la formación de un precipitado blanco.

#### **Ensayo de Wagner**

Se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, a continuación, se añadió 3 gotas del Reactivo de Wagner y se procedió a observar considerándose positivo la formación de un precipitado café.

### **b) Identificación de Flavonoides**

#### **Ensayo de Shinoda**

Se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, luego se agregó limadura de magnesio seguido de 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se procedió a observar considerándose positivo si la reacción es de rojo oscuro intenso.

### **c) Identificación de compuestos fenólicos y/o taninos**

#### **Ensayo de Cloruro Férrico (FeCl<sub>3</sub>)**

Se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, a continuación, se agregó 3 gotas del reactivo FeCl<sub>3</sub> al 10% y se procedió a observar considerándose positivo la aparición de coloración verde oscuro.

### **d) Identificación de triterpenoides y/o esteroides**

### **Ensayo de Liebermann-Burchard**

Se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, a continuación se agregó 5 gotas de ácido acético seguido de 5 gotas de anhídrido acético, luego se agregó 1 gota de ácido sulfúrico y se procedió a observar considerándose positivo para triterpenoides una coloración rojo-marrón y para esteroides la presencia de anillo color verde.

### **e) Identificación de Quinonas**

#### **Ensayo de Borntrager**

Se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, a continuación, se agregó 5 gotas del reactivo de Borntrager y se procedió a observar considerándose positivo si la reacción es de color rojo intenso o rosado oscuro.

### **f) Identificación de Azúcares reductores**

Se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, primero se mezcló Fehling A + Fehling B y luego se añadió a la muestra. Considerándose positivo un precipitado rojo.

### **g) Identificación de Saponinas**

Se colocó 1 mL extracto en un tubo de ensayo y se diluyó con 5 veces su volumen en agua y se agitó la mezcla fuertemente durante 2 minutos. Considerándose positivo la aparición de espuma de 2mm de altura en la superficie y si persistió por más de 2 minutos.

#### 2.3.4. Determinación de la toxicidad oral a 30 días del extracto de achiote en ratas (OECD, 1995).

El estudio se realizó con 20 ratas albinas (10 por sexo), con peso promedio de  $150\pm 170$  g. Los especímenes fueron aclimatados durante 7 días con alimento en pellets y agua a libertad. Seleccionados de manera aleatoria en grupos de 5 ratas cada uno, los cuales recibieron solución suero fisiológico (SSF) y extracto etanólico de cadillo 100 mg/kg, según el siguiente diseño experimental:

Grupos	Sexo	Tratamientos
Grupo I	Ratas	SSF 2 mL/kg
Grupo II	Machos	Extracto etanólico de <i>Bixa orellana</i> 100 mg/kg
Grupo III	Ratas	SSF 2 mL/kg
GrupoIV	Hembras	Extracto etanólico de <i>Bixa orellana</i> 100 mg/kg

Se utilizó alimento balanceado para ratas que será adquirido en Instituto nacional de salud INS en Chorrillos. El agua de beber será potable, Se administró los tratamientos por vía oral en dosis diaria único y durante 30 días, haciendo uso de una cánula metálica.

#### Observaciones Clínicas

La observación clínica de los especímenes permitió evaluar el estado general de los grupos, y se tuvo en cuenta la palpación del abdomen y tórax para

evidenciar el crecimiento de alguna tumoración, piel, pelo y mucosas Además de la consistencia de las heces y volumen de orina.

### **Peso corporal.**

Los especímenes fueron pesados semanalmente, y se promediará permitiendo evaluar el incremento de peso, y poder estudiar el crecimiento homogéneo de los grupos estudiados y determinar que el extracto no interfiere con su desarrollo.

### **Parámetros de química sanguínea**

Al culminar la parte experimental los especímenes anestesiados, utilizando pentobarbital sódico 30 mg/kg, administrado por vía intraperitoneal, y se extrajo sangre punción cardiaca. Estas muestras sanguíneas se utilizaron para obtener colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), triglicéridos, glucosa, úrea, glutámico pirúvico Transaminasa (TGP) y fosfatasa alcalina.

## **7.4 Procesamiento y análisis de la información**

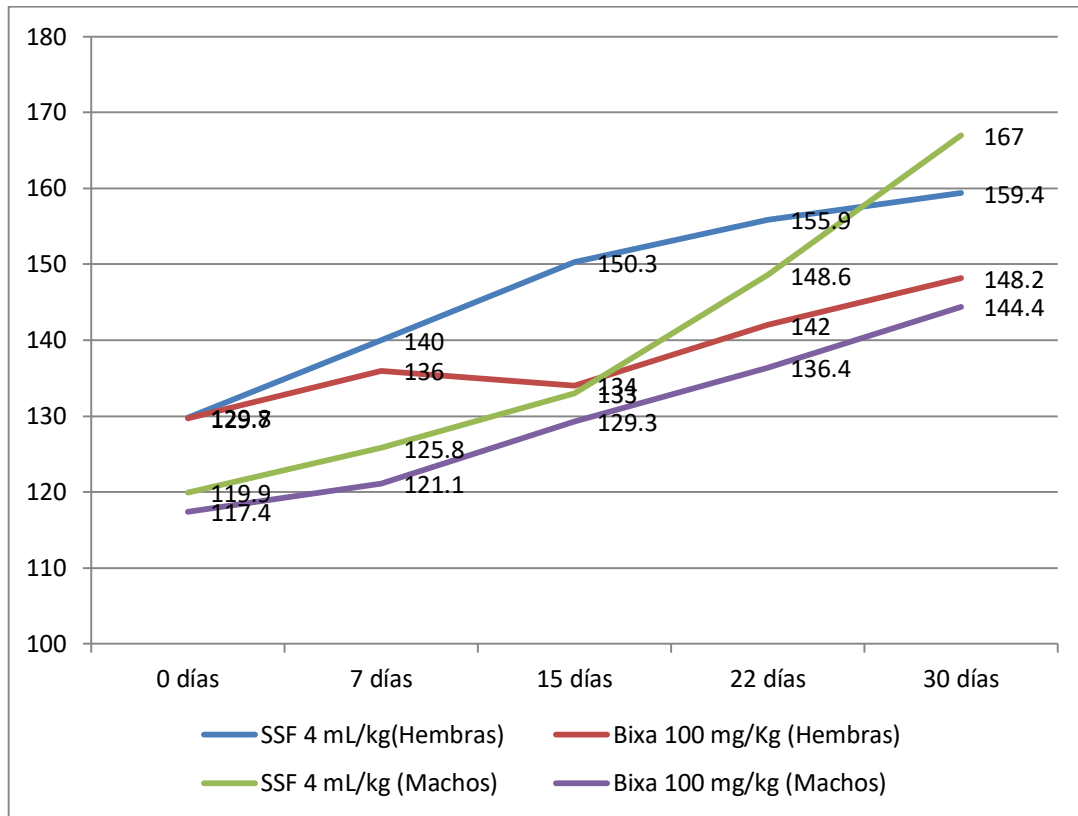
Los datos obtenidos al evaluar la toxicidad del extracto de las hojas de achiote fueron procesados utilizando el programa SPSS versión libre, estas fueron expresadas en tablas y figuras, considerando una  $p < 0,05$ .

### III. RESULTADOS

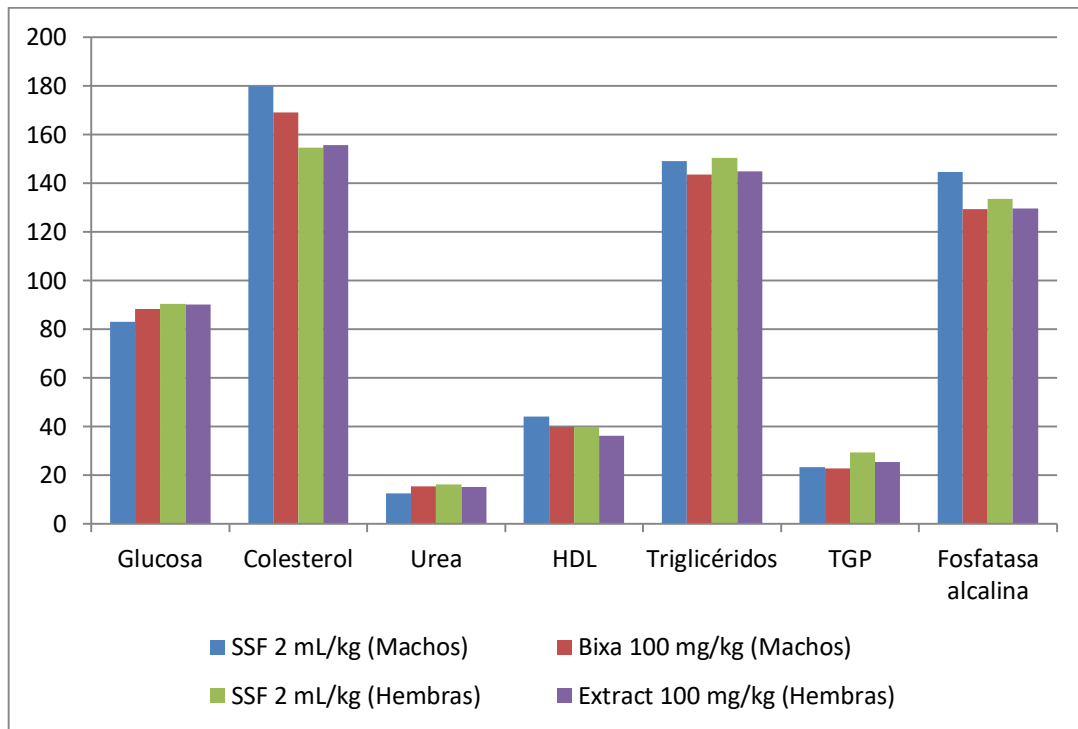
**Tabla 1.** Estudio fitoquímico preliminar del extracto de achiote.

<b>Metabolito Secundario</b>	<b>Reacción de identificación</b>	<b>Cantidad</b>
Carbohidratos.	Molisch.	++
Azúcares Reductores.	Fehling.	++
Taninos.	Tricloruro de fierro.	+++
Aminoácidos libres.	Ninhidrina.	++
Flavonoides.	Shinoda.	+++
Alcaloides.	Dragendorff.	+
Heterósidos. .antraquinónicos.	Borntrager.	+
Esteroides triterpénicos.	Lieberman.	+
Glicósidos.	Vainillin Sulfurico.	+

**Leyenda:** (+++) = *Abundante cantidad.*, (++)=*Regular cantidad.*, (+)=*Poca cantidad o trazas.*, (-)=*Ausencia.*



**Figura 1- Pesos semanales de las ratas durante 30 días de administración del extracto de achiote.**



**Figura 2. Valores de bioquímica sanguínea, posterior a la administración durante 30 días del extracto de achiote.**

#### IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El achiote es uno de los productos vegetales que se ha venido utilizando de manera tradicional debido a su localización por tanto era necesario determinar su toxicidad o inocuidad, por lo tanto se le práctico un screening fitoquímico para determinar la presencia de metabolitos secundarios, habiéndose encontrado taninos y flavonoides en mayor proporción (tabla 1.), los que de manera sinérgica podrían estar causando alteraciones en los especímenes permitiendo clasificarlos por su nivel de toxicidad.

Los productos medicinales derivados de las plantas han sido utilizados desde la antigüedad y existe evidencia de uso pero más no de su seguridad, esto ha motivado durante décadas de su evaluación para determinar los principios activos que causan la eficacia frente al tratamiento o curación de algunas enfermedades. (Villar, 1999; Bruneton, 1991).

Cuando se realizan estudios con fines de obtención de un medicamento en el mercado, demanda de múltiples investigaciones a todo nivel con la utilización de tecnología de última generación y técnicas nuevas de investigación farmacológica, demostrando calidad, seguridad y eficacia (Zbinden, 1991; Alemán, 1998).

Los cambios observados en la alimentación no se relacionan con el decremento del peso corporal, siendo el peso relacionado con la edad de los especímenes con 5 semanas de edad al inicio del ensayo, siendo esta una edad de crecimiento acelerado, luego este es estabilizado (Mosberg, 2000). (Figura 1). Lo cual demuestra que el extracto de achiote es inocuo (Universities, 1999). (Figura 1).



Los valores hematológicos son de gran importancia cuando se trata de evaluar el efecto nocivo de una sustancia en un ser vivo, ya que el tiempo del tratamiento es el que marca el nivel de toxicidad en un organismo, es decir que a mayor tiempo de administración, hay más posibilidades de que ocurra un daño profundo, sobre todo a nivel de los órganos blandos (corazón, hígado, cerebro, pulmones, entre otros. Los resultados hematológicos y bioquímicos no mostraron alteraciones importantes, los valores encontrados se encuentran dentro de los parámetros establecidos y refrendado por literatura científica, referenciado para la especie *Rattus rattus var albinus*. (Alemán, 1998; Wolford, 1986). (Figura 2).

## V. CONCLUSIONES

- Se logró obtener el extracto de achiote, mediante el método de maceración con etanol de 96°.
- El estudio fitoquímico preliminar del extracto permitió identificar la presencia de metabolitos secundarios, sobre todo de flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides y saponinas.
- Los cambios producidos por el extracto de achiote no fueron significativos: El peso de los animales, valores hematológicos y las alteraciones anatómopatológicas.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Realizar estudios con otras partes vegetales de la muestra en estudio y con la totalidad de la planta.
- Realizar ensayos con extractos con otros solventes que permitan extraer metabolitos de diversas polaridades.
- Evaluar el extracto utilizando otras vías de administración para determinar inicio de efecto y grado de toxicidad.
- Estimular a la investigación del grado de toxicidad aguda y crónica de otras especies de plantas medicinales ya que poseemos una inmensa flora y que hasta el momento no poseen estudios previos, lo cual nos permitiría encontrar nuevas terapias alternativas a muchas enfermedades y evitar intoxicaciones de las mismas cuando estas sean consumidas por única vez o en tratamientos prolongados.

## **VII. AGRADECIMIENTO**

A Nuestro Dios, por ser mi guía constante y fortaleza infinita. A mis padres por el apoyo y ejemplo de perseverancia. A mis amigos y profesores por la compañía y el apoyo que me brindan. Este logro se los dedico a ellos de todo corazón.

Gracias...

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman B, Smith S. (1987). *Las Gramíneas de México*. Barcelona: Editorial Reverté S. A.
- Alonso, J. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*. Rosario (Argentina): Editorial Corpus. pp 41-45.
- Ancalla, G., Flores, C. (2017). Evaluación del efecto antiinflamatorio de *Muehlenbeckia volcanica* Benth. en animales de experimentación. Arequipa – Perú.
- Aybar, K., Ari, V. (2018). Efecto antiinflamatorio y toxicidad aguda del extracto etanólico de las hojas de *Nasa urens* (jacq.) Weigend en animales de experimentación. Lima – Perú.
- Barra, A., Coroneo, V., Dess, S., Cabras, P., Angioni, A. (2007). Characterization of the volatile constituents in the essential oil *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *J. Agric. Chem*, 55: 7093-7098.
- Baumann, D., Friedrich, Ch., Seidlein, H.J. (1986). Arzneimittel und historischer Determinismus. *Pharmazie*; 41 (11): 806 - 811.
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de fotoquímica y farmacognosia*. España: Ed. Acribia Zaragoza.
- Cabrera, T., Casas, F., Rojas, C., & Viveros, S. (1998). *Alimentos en la naturaleza*. Algunas plantas comestibles, silvestres arvenses y ruderales. SEMARNAP. México, D.F.
- Camacho, M., Honorio, C. (2017). *Evaluación del efecto antiinflamatorio en ratas albinas según el modelo edema plantar y efecto analgésico en ratones albinos según el modelo tail flick del extracto etanólico de Dalea isidori Barneby "Yerbechil"*. Tesis de grado. UNMSM. Perú.
- Carrizo, E., Palacio, M., Roic, L. (2005) *Plantas de uso medicinal en la flora de los alrededores de la ciudad de Santiago del Estero*. Argentina.

- Centro para el Control de la Calidad de los Medicamentos. (1998). Metodología de guía para realizar un protocolo de ensayo clínico con productos herbarios. *Rev Cubana Plant Med.* 3(2):83-8.
- Centro para la Producción de Animales de Laboratorio CENPALAB. (2000). Cuba
- CYTED. (1995). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-I. *Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región.* Manual de técnicas de investigación p. 220.
- Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants.* New York: The New York Botanical Garden p.555.
- Diener, W., Schlede, E. (1999). *Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests.* ALTEX: Alternatives to Animal Experiments; 3. URL.
- Discovery de salud. (2005). *Intentan impedir el uso curativo de los productos naturales.*
- Erich, D., Juliette, M., Yasmiany, P. (2004). Regulaciones emitidas por el CECMED en el primer semestre de 2004.
- Ernst, E. (2005). The efficacy of herbal medicine an overview. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 405-409.
- Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. (1985). Medicinal Plants in Therapy. *Bull. of the World Health Organization.*; 63 (6), 965 - 981.
- Farnsworth, N.R. (1984). *Natural Products and Drug Development.* Munksgaard, Copenhagen, Dinamarca: 17 - 30.
- Fonnegra, R., Jiménez, S. (1999). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia.* Colombia.
- García, M. (2000). *Legislación en iberoamericana sobre fitofármacos y productos naturales.* San José. Costa Rica.
- Herbario de Plantas Medicinales. (2009). Centro Nacional de Salud Intercultural (CENSI) - Instituto Nacional de Salud (INS). Perú.

- Lagarto, A., Couret, M., Guerra, I., López, R. (2008). Toxicidad aguda oral y ensayos de irritación de extractos acuoso e hidroalcohólico de *Momordica charantia* L. *Rev Cubana Plant Med*, vol.13, n.3.
- Lagarto, A., Tillán, J., Bueno, V., Chávez, I., Guerra, I., Vega, Y., Valdés, O. (2005). Gabilondo, Toxicidad aguda oral y subcrónica en ratas de un extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. *Revista de Toxicología*, (3):175- 179. España.
- La Torre, L. (2014). Evaluación del efecto antiinflamatorio de *Zingiber officinale* Roscoe (Jengibre) en animales de experimentación. Arequipa – Perú.
- Larrey, D. (1994). *Liver involvement in the course of phytotherapy*. *Presse Med.* 23: 691-693.
- Li, E. (2010). El Futuro de las Plantas Medicinales del Altiplano y los Valles Centrales de los Andes.
- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales*. 2º Edición. Lima: Fondo Editorial PUCP.
- Marcia, A., Jerome, P., Kassirer, D. (2007). Medicina alternativa. Los riesgos de remedios no probados, no regulados. *Engl J Med.* 12(2).
- Morón, F. (2002). *Plantas medicinales y medicamentos herbarios*. En: Morón FJ, Levy M. *Farmacología general*. La Habana. p. 195-205.
- Mukherjee, P. (2002). *Control de calidad de medicamentos herbales*. Business Horizons (ed). New Delhi.
- Núñez, M. (2011). Efecto antiinflamatorio y toxicidad aguda del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) en ratones albinos. Cusco – Perú.
- Okerele, O. (1984). *Programas de medicina tradicional: progresos y perspectivas*. *Crónicas OMS*; 38(2):83-8.
- Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. (1995). Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. N° 47.

- Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. (1998). *Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental. Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, 1998 in November 1998.*
- Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. (1999). Guidelines for the Testing of Chemical. Citado el 30 setiembre del 2009.
- Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. (2000). *Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method.*
- Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. (2001). *Guideline for testing of chemicals. Organization for Economic Co-operation and Development.* Guide No. 425. Up and Down Procedure. URL.
- Organismo Andino de Salud. (2014a). Convenio Hipólito Unanue. Plantas medicinales de la Sub Región Andina. Lima - Perú.
- Organismo Andino de Salud. (2014b). Convenio Hipólito Unanue. Lista de plantas medicinales de la Sub Región Andina propuestas para su integración en los sistemas de salud. Lima - Perú.
- Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. (2000). *Revised Draft Guideline 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. OECD Guideline for Testing of Chemicals.* Disponible en: <http://www.oecd.org>.
- Pascual-Villalobos, M.J. (1998). Repelencia, inhibición del crecimiento y toxicidad de extractos vegetales en larvas de *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Bol. San. Veg. Plagas.* 24, 143-154.
- Pérez, M., Cid, M., Méndez, R., Rodríguez, M., Arboláez, M. (2007). Proposal of guideline for clinical trial protocols with herbal drugs. *J Biomed.* Disponible en: <http://biomed.uninet.edu/2007/n1/perez.html>



- Silbergeld, E. (1998). Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo INSHT / Ministerio de Empleo y Seguridad Soc
- Soukup, S. (1970). *Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana*. Lima ; 70-72
- Taylor, V.E. (2000). Tyler's Honest Herbal. The Haworth Herbal Press, 4<sup>th</sup> ed. pp 1-8
- Universities Federation for Animal Welfare. (1999). The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals. 7.ed. V.1. Terrestrial vertebrates. Part 3, Species kept in the laboratory. Blackwell Science Ltd.
- Vázquez, G., Cuevas, G., Cochran, T., Iltis, H., Santana, M., Guzmán, H. (1995). Flora de Manantlán. UdeG-IMECBIO/University of Wisconsin-Madison, BRIT. Forth Worth, TX, USA.
- Velazco, G., Méndez, R. (1999). Medicamentos. Registro de medicamentos herbarios. *Rev Cubana Plant Med*; 1(4):44-7
- Villaescusa, C. (2006), La adormidera. Una fuente de alcaloides de extraordinario interés. *AFT*;4(4):252-9
- Villar, A.M. (1999). *Farmacognosia General*. Madrid, Ed Síntesis.
- Wolford, S.T-, Schroer, R.A., Gohs, F.X., Gallo, P.P., Brodeck, M., Falk, H.B., et al. (1986). Base de datos del rango de referencia para la química del suero y los valores de hematología en animales de laboratorio. *J Toxicol Environm Health* 18, 161-88.
- Zbinden, G. (1991). Valor predictivo de los estudios en animales en toxicología. *Regulat Toxicol Pharmacol*. 14,167-77.
- Zang, X. (1996). Traditional Medicine WHO. *Hardard Medicus*. 39 (3): 103.
- Zuluaga, G. (1992). *Uso tradicional de las plantas medicinales en Colombia, Simposio de plantas medicinales. Memorias Universidad Javeriana*. 19-39.

Zuluaga, G. (2002). *Panorama actual de las Medicinas Tradicionales*. En:  
Seminario Internacional de Etnomedicina. P13-27. Bogotá D. C.

## IX. ANEXOS

### Anexo 01- Pesos promedios de las ratas al evaluar la toxicidad oral del extracto de achiote durante 30 días.

tiempo	<i>SSF 4 mL/kg. (Hembras)</i>	<i>Bixa 100 mg/Kg. (Hembras)</i>	<i>SSF 4 mL/kg. (Machos)</i>	<i>Bixa 100 mg/kg.(Machos)</i>
0 días	129.8	129.7	119.9	117.4
7 días	140	136	125.8	121.1
15 días	150.3	134	133	129.3
22 días	155.9	142	148.6	136.4
30 días	159.4	148.2	167	144.4

**Anexo 02- valores promedios de la bioquímica sanguínea en ratas al evaluar la toxicidad oral a 30 días del extracto de achiote**

<b>Tratamiento</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Colesterol</b>	<b>Urea</b>	<b>HDL</b>	<b>Triglicéridos</b>	<b>TGP</b>	<b>Fosfat alcalina</b>
<b>SSF 2 mL/kg (Machos)</b>	83.15	180	12.4	44.01	149	23.2	144.7
<b>achiote 100 mg/kg (Machos)</b>	88.4	169	15.4	39.8	143.6	22.8	129.45
<b>SSF 2 mL/kg (Hembras)</b>	90.5	154.5	16.3	39.9	150.4	29.3	133.5
<b>achiote 100 mg/kg (Hembras)</b>	90.03	155.7	15	36.3	144.9	25.4	129.6